

技術論文

プロエンハンサー基質を用いる製剤中のリパーゼ活性の
簡易、迅速な化学発光測定有馬貴美代¹, 一番ヶ瀬智子¹, 大庭 義史¹, 岸川 直哉¹, 黒田 直敬^{®1}

製剤中リパーゼ活性の簡便かつ迅速な化学発光定量法を確立した。本法は、プロエンハンサー基質からリパーゼにより遊離するエンハンサー（化学発光増強剤）が、ルミノール/西洋わさびペルオキシダーゼ/過酸化水素の化学発光を増強する現象を利用したものである。化学発光定量条件を最適化したのち、本法を3種の市販製剤中のリパーゼ活性測定に適用したところ、これら製剤中のリパーゼ活性を良好に定量することができた。また、本法により得られたリパーゼ活性値と日本薬局方収載の脂肪消化力試験（中和滴定法）により得られた値とを比較したところ、両測定法の間に良好な相関性が得られ（ $r > 0.919$ ）、本法の信頼性を確認することができた。今回構築した化学発光法は操作が簡便で、測定も5分で完了する。また、本法は滴定法と比較して高感度であり、再現性も良好なことから、リパーゼ含有製剤の品質管理などに有用な方法であると考えられる。

1 緒 言

化学発光とは、化学反応により分子が励起されて不安定な励起状態となり、その後もとの安定な基底状態に戻る際に光を放出する現象である。化学発光を用いる分析法は励起光源を必要としないことから光源に由来するノイズの影響がなく、一般に比色法や蛍光法と比較して高感度である。したがって、簡便性、迅速性や高感度が要求される臨床検査分野の酵素活性測定などにおいて、化学発光法はこれらを満たす分析法の一つとして有用である。すでにこの目的で化学発光性の酵素基質、特にエステラーゼの合成基質が数多く報告されている^{1)~7)}。

一方、様々な化学発光物質の中でもルミノール（5-アミノ-2,3-ジヒドロ-1,4-フタラジンジオン）は、過酸化水素の存在下、西洋わさびペルオキシダーゼ（HRP）を触媒とする反応により、強い発光を与えることが知られている^{8)~14)}。著者らはこれまでにロフィン骨格を有する2-(4-ヒドロキシフェニル)-4,5-ジフェニルイミダゾール（HDI）がこのルミノール/HRP/過酸化水素の化学発光系に対し優れた増強効果を示すことを見だし、増強剤としての有用性を明らかにしてきた¹⁵⁾。更に、このHDIの増強効果がそのフェノール部位に由来することに着目し、このフェノール性水酸基部分をラウリン酸エステルとしたプロエンハンサー基質 HDI-laurate を開発し、これを用いる簡便かつ迅速なリパーゼ（トリアシルグリセロールリパーゼ、

EC 3.1.1.3）活性の化学発光定量法を報告してきた¹⁶⁾。この方法は、リパーゼが基質に作用して遊離する HDI の生成量に応じてルミノールの化学発光が増強され、これによりリパーゼ活性を算出するという原理に基づくものである（Fig. 1）。ここで基質である HDI-laurate は増強作用を全く示さないため、同一試験管内でリパーゼによる加水分解反応とその反応生成物である HDI による増強化学発光反応を行うことが可能となり、酵母由来及び動物由来のリパーゼを簡便かつ迅速に測定することが可能となった¹⁶⁾。

リパーゼはトリグリセリドの長鎖脂肪酸エステルを加水分解し、脂肪の分解を行う酵素であり、動植物から微生物に至るまで広く分布し、産業や医療面などで広く利用されている^{17)~21)}。例えば微生物由来のものは洗剤及び油脂の改質や精製などに、動物由来のものは乳フレーバーの製造などに用いられている。また、日本人の食生活の変化による脂肪の摂取量は急激に増加しており、消化不良や過食による胃部・腹部の膨満感を改善するため、リパーゼ含有総合健胃消化薬やサプリメントが広く流通している。

本研究では、すでに報告した HDI-laurate を用いるリパーゼ活性の化学発光定量法の実用性を証明する目的で、市販製剤中のリパーゼ活性の簡便、迅速な定量法の開発を行った。消化酵素製剤や消化サプリメントには、ブタ膵由来のリパーゼ及び種々の酵母由来のリパーゼが混合して用いられているので、これらを効果的に測定できるよう分析条件の最適化を行った。更に日本薬局方一般試験法の消化力試験により得られる製剤中のリパーゼ活性値と本法で測定した活性値とを比較し、本法の信頼性を評価した。

¹ 長崎大学大学院医歯薬総合研究科生命薬科学専攻: 852-8521
長崎県長崎市文教町 1-14

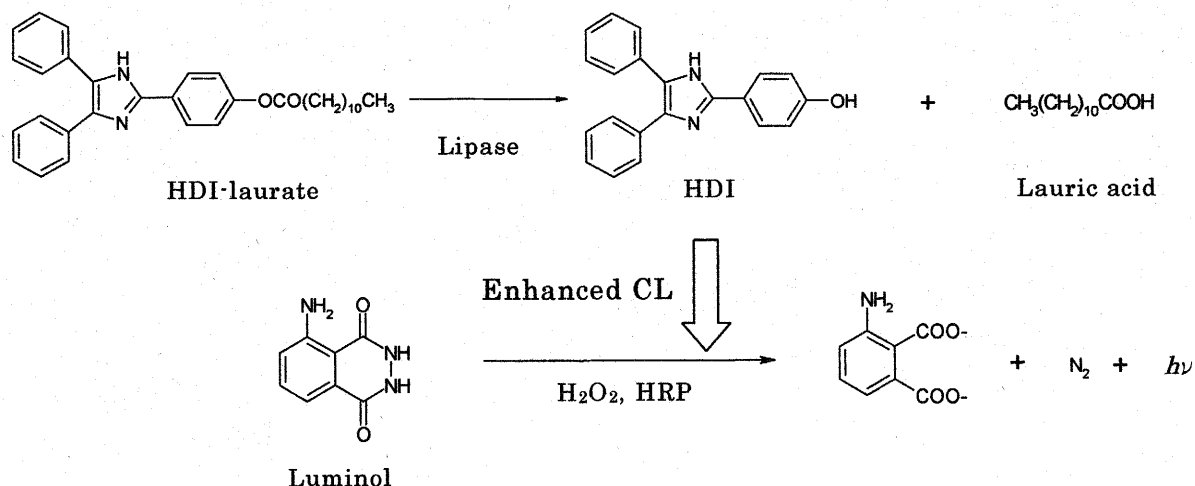


Fig. 1 Reaction scheme for the chemiluminescence (CL) assay of lipase

2 実 験

2.1 装 置

化学発光検出器: Sirius-Luminometer (Berthold Japan 製) を用いて測定を行った。

乳化器: BRANSON SONIFIER 250 D (Japan Emason 製) を用いて基質溶液を超音波処理により乳化した。

2.2 試 料

BERIZYM (顆粒剤) は塩野義製薬, NEO FLASE CAPSULES (カプセル剤) は日本新薬, EXCELAASE CAPSULES (カプセル剤) は明治製菓より購入した。各製剤 (カプセル剤は内容物のみ) はそれぞれ乳鉢を用いて粉碎したものを用いた。

2.3 試 薬

ポリビニルアルコール, エタノール及びアセトンはナカライ製, オリブ油 (日本薬局方) は大成薬品工業製のものを使用した。無水リン酸一水素ナトリウム, リン酸二水素カリウム, 塩化ナトリウム, 水酸化ナトリウム, フェノールフタレイン, 36% 塩酸, ルミノール, リン酸二水素ナトリウム二水和物及び 30% 過酸化水素は和光より購入した。HRP は Sigma, 2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール (Tris) は高純度のものを ICN Biomedicals よりそれぞれ購入した。なお化学発光法で用いた 36% 塩酸, *N,N*-ジメチルホルムアミド (DMF) (ナカライ製) 及びメチルセロソルブ (キシダ化学製) は精密分析用のものを使用し, それ以外の試薬はすべて分析試薬級を用いた。

2.4 測定法

2.4.1 化学発光測定法

測定用試験管に 0.1 M リン

酸塩緩衝液 (pH 6.5) で懸濁させた製剤 110 μl , リパーゼ基質である 1 mM HDI-laurate の DMF 溶液 10 μl , 30 μM ルミノール及び 45 nM HRP をそれぞれ含む 0.1 M リン酸塩緩衝液 (pH 6.5) 各 50 μl を順次とり, 5 秒間混和した。これに過酸化水素水溶液 (200 μl) を自動注入し, 化学発光反応を開始した。測定開始後 60 秒から 300 秒までの発光量を積算した。なお, 測定値は 3 回繰り返し測定を行い, その平均で表した。

2.4.2 脂肪消化力試験法²²⁾

日本薬局方一般試験法

に従い, 製剤中のリパーゼ活性を測定した。

乳化液: ポリビニルアルコール 5 g に水を 200 ml 程度加え, かき混ぜながら 75~80 $^{\circ}\text{C}$ で約 1 時間加熱して溶かした。冷却後, 汙過し, 水を加えて正確に 250 ml とした。

基質溶液: 乳化液/オリブ油混液 (3:1, v/v) 300 ml を超音波処理により乳化し, 1 時間冷所放置後, 油層が分離しないことを確認した後に使用した。

操作法: 基質溶液 5 ml 及び 0.4 M リン酸塩緩衝液 (pH 8.0) 4 ml をそれぞれ正確に量り, 三角フラスコに入れてふり混ぜ, 37 $\pm$ 0.5 $^{\circ}\text{C}$ で 10 分間放置した後, 試料溶液 1 ml を正確に加え, 直ちにふり混ぜた。この液を 37 $\pm$ 0.5 $^{\circ}\text{C}$ で正確に 20 分間放置した後, エタノール/アセトン混液 (1:1, v/v) 10 ml をふり混ぜた。次に 0.05 M 水酸化ナトリウム液 10 ml を正確に加え, 酵素反応により生じる脂肪酸と反応させた。反応液にエタノール/アセトン混液 (1:1, v/v) 10 ml を加えてふり混ぜた後, 過量の水酸化ナトリウムを 0.05 M 塩酸で滴定した (指示薬: フェノールフタレイン試液 2~3 滴)。

別に空試験として以下の操作を行った。基質溶液 5 ml 及び 0.4 M リン酸塩緩衝液 (pH 8.0) 4 ml をそれぞれ正確に量り, 三角フラスコに入れてふり混ぜ, 37 $\pm$ 0.5 $^{\circ}\text{C}$ で 10 分間放置した後, エタノール/アセトン混液 (1:1,

v/v) 10 ml を加え, 次に試料溶液 1 ml を正確に加えてふり混ぜた。次に 0.05 M 水酸化ナトリウム液 10 ml を正確に加え, 以下同様に塩酸を用いて滴定した。

なお, 測定値は空試験による滴定量と試料溶液による滴定量の差で示した。

3 結果と考察

3.1 化学発光法における測定条件の最適化

製剤中には酵母由来及びブタ膵由来の両方のリパーゼが混合して用いられるため, 既報⁶⁾で個別に確立した活性測定条件 (*Candida cylindracea* 由来及びブタ膵由来のリパーゼ活性測定条件) のうち, どちらがより製剤中のリパーゼ活性測定に適しているかを調べた。両測定法において大きく異なる点は緩衝液の種類であるため, 試料として BERIZYM 0.2 mg ml⁻¹ を用いて, 0.3 M Tris-HCl 緩衝液

(pH 7.5) 及び 0.1 M リン酸塩緩衝液 (pH 6.5) が化学発光強度に与える影響を調査した。BERIZYM により得られるシグナル強度はリン酸塩緩衝液に比べて Tris-HCl 緩衝液の方が大きかったが, 空試験強度はリン酸塩緩衝液がより低い値を与えたため, 結果としてリン酸塩緩衝液がわずかに高い S/B 比を与えた。そこで, 製剤中リパーゼ活性の測定にはリン酸塩緩衝液を用いることにした。

次に, 試料として BERIZYM 0.2 mg ml⁻¹ を含む 0.1 M リン酸塩緩衝液 (pH 6.5) を用いて, 基質である HDI-laurate の濃度の影響を調べた (Fig. 2)。HDI-laurate の濃度を 0~2 mM の範囲で変化させたところ, HDI-laurate の濃度の増加とともに発光量は増加し, 0.5 mM 以上用いたときにほぼ最大かつ一定の発光量が得られた。ここでは 1 mM を選択した。

3.2 化学発光法と脂肪消化力試験法との比較

消化酵素製剤の安定性や効力は日本薬局方一般試験法の消化力試験法により評価されている。そこで, 日本薬局方収載の脂肪消化力試験法に従い, リパーゼ含有製剤 3 種 (BERIZYM, NEO F-LASE CAPSULES, EXCELAASE CAPSULES) のリパーゼ活性を測定し, 本法により得られる結果と比較した。両方法により得られた結果を Table 1 及び Table 2 に示す。いずれにおいても, 試料濃度と測定値の間に良好な相関関係が得られたが, 両者の検出下限を比較した場合, 化学発光法の方が約 4 倍から 6 倍高感度であった。本法の信頼性を評価する目的で, 両測定法により得られる測定値間の相関性を調べた。なお, 化学発光法により測定する製剤試料には, 滴定法により測定した試料をリン酸塩緩衝液でそれぞれ 10 倍希釈した試料を用いた。一例として Fig. 3 に BERIZYM より得られる両測定法の相関性を示す。Table 3 に示すように, いずれの製剤においても化学発光法と脂肪消化力試験法との間に良好な相

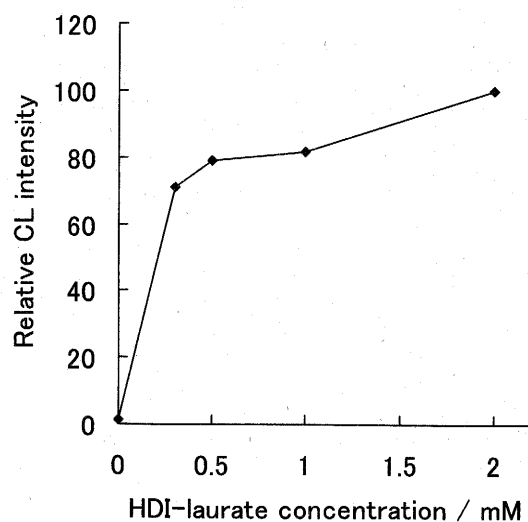


Fig. 2 Effect of HDI-laurate concentration on Relative CL intensity (RCI)

Table 1 Analytical parameters for lipase activity in pharmaceutical preparations obtained by the titration method

Pharmaceutical preparations	Range/mg ml ⁻¹	Equation (r) ^{a)}	Detection limit/mg ml ⁻¹ b)
BERIZYM	1.0~8.0	$y = 0.30x + 0.17$ (0.985)	0.12
NEO F-LASE CAPSULES	1.0~8.0	$y = 0.30x + 0.14$ (0.979)	0.12
EXCELAASE CAPSULES	1.0~8.0	$y = 0.27x + 0.03$ (0.976)	0.13

a) y = blank titer (ml) - signal titer (ml), x = concentration of pharmaceutical preparation (mg ml⁻¹); b) Defined as blank titer + 3 SD

Table 2 Analytical parameters for lipase activity in pharmaceutical preparations obtained by the CL method

Pharmaceutical preparations	Range/mg ml ⁻¹	Equation (r) ^{a)}	Detection limit/mg ml ⁻¹ b)
BERIZYM	0.05~0.40	$y = 2.0 \times 10^9 x - 2.6 \times 10^7$ (0.996)	0.02
NEO F-LASE CAPSULES	0.05~0.20	$y = 2.3 \times 10^9 x - 3.3 \times 10^7$ (0.977)	0.02
EXCELAASE CAPSULES	0.05~0.40	$y = 1.2 \times 10^9 x + 3.6 \times 10^7$ (0.989)	0.03

a) y = CL intensity, x = concentration of pharmaceutical preparation (mg ml⁻¹); b) Defined as blank chemiluminescence + 3 SD

Table 3 Correlation between the lipase activities obtained by the CL and titration method

Pharmaceutical preparations	Range/mg ml ⁻¹ in titration method	Equation ^{a)} (Sample number)	Correlation factor
BERIZYM	0~4.0	$y = 5.2 \times 10^8 x - 5.6 \times 10^7$ ($n = 5$)	0.988
NEO F-LASE CAPSULES	0~2.0	$y = 4.9 \times 10^8 x - 1.5 \times 10^7$ ($n = 4$)	0.919
EXCELAASE CAPSULES	0~4.0	$y = 3.7 \times 10^8 x + 2.6 \times 10^7$ ($n = 4$)	0.994

a) y = CL intensity, x = blank titer (ml) - signal titer (ml)

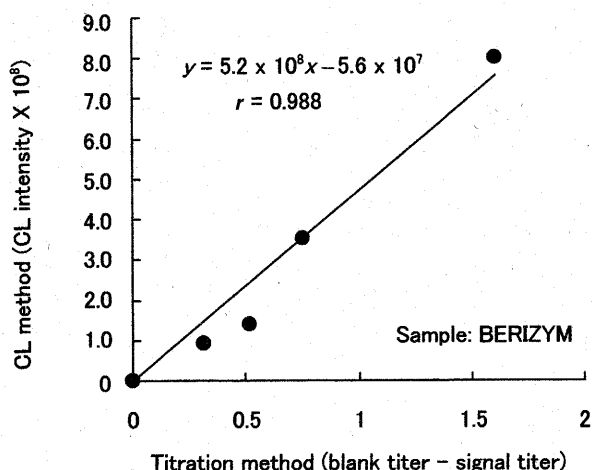


Fig. 3 Correlation between the lipase activities obtained by the titration and CL method

関性が見られた。

また、脂肪消化力試験法の繰り返し測定の精度を NEO F-LASE CAPSULES 2 mg ml⁻¹ 及び 8 mg ml⁻¹ を試料に用いて調べたところ、それぞれ相対標準偏差 (RSD) で 9.2% 及び 9.7% であった。これに対し、化学発光法の精度は、NEO F-LASE CAPSULES 0.1 mg ml⁻¹ 及び 0.2 mg ml⁻¹ の試料に対して、それぞれ RSD で 8.5% 及び 6.7% であった。脂肪消化力試験法は基質としてオリブ油を用い、リパーゼとの反応で遊離する脂肪酸量を中和滴定により求める方法である。ここで、用いる基質の懸濁液は超音波処理により調製される。しかし、均一な乳濁液を再現良く調製するには比較的熟練を要し、測定値に個人差や誤差が生じやすいと考えられる。一方、化学発光法で用いる基質は DMF に溶解するのみであり、すべての反応を同一試験管内で行うことが可能である。このことが化学発光法においてより良好な精度を与えた要因であると考えられる。更に化学発光法は滴定法のようにインキュベーションを必要とせず測定時間が 5 分間と短い、簡便かつ迅速な測定方法である。

以上、プロエンハンサー基質及び化学発光定量法を用いることにより、簡便かつ迅速な製剤中リパーゼ活性の定量

法を確立することができた。本法は、従来の滴定法と比較して、感度及び精度の面でも優れており、リパーゼ含有製剤の品質管理などに有用な方法であると考えられる。

文 献

- 1) L. J. Krica, J. C. Voyata, I. Bronstein: *Methods Enzymol.*, **305**, 370 (2000).
- 2) H. Arakawa, A. Kokado, S. Yoshizawa, M. Maeda, A. Tokita, Y. Yamashiro: *Anal. Sci.*, **15**, 943 (1999).
- 3) I. Bronstein, B. Edwards, J. C. Voyata: *J. Biolumin. Chemilumin.*, **4**, 99 (1989).
- 4) V. K. Jain, I. T. Magrath: *Anal. Biochem.*, **199**, 119 (1991).
- 5) M. Nakazono, H. Nohta, K. Sasamoto, Y. Ohkura: *Anal. Sci.*, **8**, 779 (1992).
- 6) L. J. Krica, D. Schmerfeld-Pruss, B. Edwards: *J. Biolumin. Chemilumin.*, **6**, 231 (1991).
- 7) A. N. Diaz, F. G. Sanchez, M. C. Ramos, M. C. Torijas: *Sensor Actuat. B-Chem.*, **82**, 176 (2002).
- 8) 今井一洋編: “生物発光と化学発光 基礎と実験”, (1989), (廣川書店).
- 9) 三田智文, 今井一洋: 臨床検査, **38**, 150 (1994).
- 10) 中島憲一郎: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **49**, 135 (2000).
- 11) A. N. Diaz, F. G. Sanchez, J. A. Gonzalez Garcia: *J. Biolumin. Chemilumin.*, **13**, 75 (1998).
- 12) H. R. Schroeder, F. M. Yeager: *Anal. Chem.*, **50**, 1114 (1978).
- 13) P. M. Easton, A. C. Simmonds, A. Rakishev, A. M. Egorov, L. P. Candeias: *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 6619 (1996).
- 14) G. H. G. Thorpe, L. J. Kricka: *Methods Enzymol.*, **133**, 331 (1986).
- 15) N. Kuroda, R. Shimoda, M. Wada, K. Nakashima: *Anal. Chim. Acta*, **403**, 131 (2000).
- 16) T. Ichibangase, Y. Ohba, N. Kishikawa, K. Nakashima, N. Kuroda: *Luminescence*, **19**, 259 (2004).
- 17) 岩井美枝子: “リパーゼ その基礎と応用”, p. 245 (1991), (幸書房).
- 18) N. W. Tietz, D. F. Shuey: *Clin. Chem.*, **39**, 746 (1993).
- 19) R. J. Vissers, R. B. Abu-Laban, D. F. McHugh: *J. Emerg. Med.*, **17**, 1027 (1999).
- 20) R. Gupta, P. Rath, N. Gupta, S. Bradoo: *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **37**, 63 (2003).
- 21) K. E. Jaeger, B. W. Dijkstra, M. T. Reetz: *Annu. Rev. Microbiol.*, **53**, 315 (1999).
- 22) 厚生労働省: 第十四改正日本薬局方, p. 39 (2001).

Simple and Rapid Chemiluminescence Assay for Lipase Activity in Pharmaceutical Preparations Using Proenhancer Substrate

Kimiyo ARIMA¹, Tomoko ICHIBANGASE¹, Yoshihito OHBA¹,
Naoya KISHIKAWA¹ and Naotaka KURODA¹

¹ Graduate School of Biomedical Sciences, Course of Pharmaceutical Sciences, Nagasaki University, 1-14, Bunkyo-machi, Nagasaki-shi, Nagasaki 852-8521

(Received 13 February 2006, Accepted 23 March 2006)

A novel chemiluminescence (CL) assay method, using a HDI-laurate [lauric acid ester of 2-(4-hydroxyphenyl)-4,5-diphenylimidazole (HDI)] as a proenhancer substrate, was applied to the determination of lipase (triglycerol lipase, EC 3.1.1.3) activity in pharmaceutical preparations. The method is based on an enhanced CL reaction of luminol-horseradish peroxidase (HRP)-hydrogen peroxide with HDI, which is liberated from the proenhancer substrate by enzymatic hydrolysis. The proposed method involves a homogeneous reaction system in which enzymatic hydrolysis of HDI-laurate and enhanced CL reaction with HDI occur in the same reaction mixture. The lipase activities of three commercially available preparations were measured by the proposed CL method. Linear relationships were obtained ($r > 0.977$) between the concentrations and CL intensities in all of the tested preparations. The results obtained by the proposed method were compared with those by the titration method in Japanese Pharmacopoeia, and good correlations were obtained between both methods ($r > 0.919$). The CL method is simple and rapid, permitting the completion of single assay within 5 min. The sensitivity and repeatability of the CL method were also superior to those of the titration method.

Keywords : chemiluminescence; lipase activity; pharmaceutical preparations; proenhancer; 2-(4-hydroxyphenyl)-4,5-diphenylimidazole.